

Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar

Biológia Doktori Iskola

Vezetője: Dr. Erdei Anna, egyetemi tanár, akadémikus

Szerkezeti Biokémia Doktori Program

Vezetője: Dr. Gráf László, egyetemi tanár, akadémikus

Doktori értekezés tézisei

GABA jelátvitel a fejlődő egér szemlencsében

Kwakowsky Andrea

Témavezető: Dr. Szabó Gábor, tudományos főmunkatárs

Géntechnológiai és Fejlődés-Neurobiológiai Osztály

Molekuláris Biológiai és Genetikai Kutatócsoport

Magyar Tudományos Akadémia

Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet

2008

Bevezetés

A neurotranszmittereket főleg a neuronális kommunikációval társítjuk, de ezek a kis molekulák befolyásolják a neuronális differenciációt és szerepet játszanak egyéb szövetek, szervek fejlődésének szabályozásában is.

Az idegrendszer fő gátló neurotranszmittereként ismert γ -aminovajsav (GABA), a fejlődő idegrendszerben parakrin/autokrin szignál molekulaként befolyásolja az idegsejt proliferációt, migrációt, differenciációt. Továbbá, hasonló mechanizmussal szerepet játszik számos perifériás szövet fejlődésének a szabályozásában is. A GABA hatás pontos mechanizmusa azonban kevésbé ismert, melynek oka a GABA hatásmechanizmusának sokfélesége és a jelátvitel összetettsége.

A szemlencse egyszerűsége és jól dokumentált fejlődése miatt már régóta felkeltette az érdeklődést, mint modell rendszer számos jelátviteli molekula vizsgálatának céljából. Azzal a sejt szintű és molekuláris komplexitással ellentétben, amely jellemző szinte minden szövetre, és különösen az idegrendszerre, a szemlencse viszonylag egy egyszerű rendszer: a korai szemlencse kezdeményt egy metabolikusan aktív egyrétegű hám alkotja, melynek a proliferációja és differenciója által keletkeznek a lencsét alkotó rostsejtek. A szemlencsét regionális kompartmentalizáltsága szintén alkalmassá teszi bonyolult jelátviteli útvonalak tanulmányozására, mivel itt a sejt proliferáció (hámsejtek) és differenciáció (rostsejtek) térben jól elkülönül. Ezért a szemlencse egy ideális modell lehet a GABA hatásmechanizmusának vizsgálatára olyan folyamatokban, mint a proliferáció és differenciáció. Kísérleteinkhez az egér szemlencsét választottuk, mivel ebben a fajban rendelkezésre állnak azok a molekuláris-genetikai módszerek, amelyekkel a gének működése az egész állatban tetszőlegesen módosítható.

A következő fejezetekben azokat a kísérleteinket foglalom össze, melyeket a GABA fejlődésszabályozó szerepének és a GABA jelátvitel molekuláris mechanizmusának feltárása céljából végeztünk el egy egyszerű modellt használva, az egér szemlencsét.

Célkitűzések

Munkánk alapvető célkitűzése a GABA jelátvitel szerepének tanulmányozása és a GABA hatás molekuláris mechanizmusának feltárása volt a fejlődés során, az egér szemlencsét használva modell rendszerként. Röviden összefoglalva a következő kísérleteket terveztük:

- (1) A GABA és a szintézisét végző glutaminsav-dekarboxiláz (GAD) enzim különböző formáinak kimutatása, továbbá térbeli és időbeli expressziójának jellemzése az egér szemlencse fejlődése során.
- (2) A GABA jelátvitel többi komponensének, a GABA_A és GABA_B receptor alegységek, valamint vezikuláris és membrán transzporterek kimutatása és jellemzése a fejlődő egér szemlencséjében.
- (3) Primer lencsehám sejt kultúra létrehozása és jellemzése a GABA jelátvitel *in vitro* tanulmányozásához.
- (4) A GABA jelátvitel funkcionálisának vizsgálata intakt szemlencséjében és primer lencsehám sejt kultúrában kalcium-„imaging” technika segítségével.
- (5) Olyan transzgenikus egérvonalak létrehozása és jellemzése, melyek a lencse specifikus α A-crystallin promóter irányítása alatt túltelmezik a GAD67-et a szemlencséjében.
- (6) A megváltozott GABA szint hatásainak vizsgálata a sejt proliferáció és differenciáció folyamataira az egér szemlencséjében, a CrysGAD67 és a GAD65/GAD67 génkiütött transzgenikus egerek felhasználásával.

Módszerek

1. Kísérleti állatok. A kísérleteket C57Bl6 (Charles Rivers), FVB/Ant (Errijgers et al., 2007) vad típusú, GAD65-GFP, CrysGAD67 transzgenikus egereken, továbbá GAD65 és GAD67 géнкиütött (knock-out, KO) egereken végeztük, melyeket a Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet Orvosi Géntechnológiai Részlegének SPF állatházában tenyésztettünk.

2. Genetikailag módosított egerek. A laboratóriumunkban készült GAD65-GFP transzgenikus egérvonalban a fluoreszcens GFP markergén expresszióját a GAD65 gén promótere irányítja. A GAD67-GFP knock-in/GAD65 knock-out egér vonalakat Yuchio Yanagawa készítette, és bocsátotta rendelkezésünkre. A CrysGAD67 transzgenikus egér vonal létrehozását a következő fejezet foglalja össze röviden.

3. A CrysGAD67 transzgenikus egér előállítás. A Crys-GAD67-GFP transzgén elkészítéséhez, a GAD67-hCGFP fúziós gént az α A-crystallin promótert tartalmazó vektorba (CPV-2), a promóter és az SV40 vírus splicing/poliadenilációs jele közé illesztettük be. Az izolált Crys-GAD67-GFP DNS fragmentumot FVB/N egerek megtermékenyített petesejtjének hím előmagjába injektáltuk. A potenciális vonalalapító egyedeket P^{32} -jelölt SV40 eredetű transzgén specifikus próbával végzett Southern hibridizációval azonosítottuk. A keresztezések során a transzgenikus utódokat farok DNS mintákból transzgén specifikus PCR-el azonosítottuk. A CrysGAD67 homozigóta egyedeket Dot blot analízissel szelektáltuk, majd vad típusú egerekkel való visszakeresztezéssel bizonyosodtunk meg arról, hogy a vonal a transzgénre nézve valóban homozigóta.

4. Reverz-transzkriptáz kapcsolt polimeráz láncreakció (RT-PCR) RNS szint meghatározására. A begyűjtött szemlencséből RNS-t izoláltunk. Az RNS preparátumok tisztaságának ellenőrzése és koncentrációjának meghatározása az optikai denzitás 260 és 280 nm-en való mérésével történt. Három mikrogramm RNS-t cDNS-sé írtunk át RevertAidTM H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit segítségével random

hexamer primert használva. A polimeráz láncreakciót gén specifikus primerek felhasználásával a cDNS egy tizedének felhasználásával végeztük.

5. Western blot analízis. A frissen izolált szemlencsákat SB pufferban homogenizáltuk és 30 µg fehérjét tartalmazó minákat 10% SDS-PAGE-en választottuk le, majd membránra vittük át. A membránokat GAD fehérje elleni antitestekkel, majd alkalikus foszfatáz konjugált másodlagos ellenanyaggal inkubáltuk és előhívtuk. A GAD formák kimutatásához az anti-pan GAD nyúl # 6799 szérumot használtuk.

6. Immunhisztokémia és immuncitokémia. A szöveteket és a primer lencse sejt kultúrákat 4% (w/v) paraformaldehiddel (PFA) PBS-ben, a GABA kimutatásához pedig 4% PFA-0.1% glutáraldehid-PBS-ben fixáltuk. A szövetekből kriosztáttal 20 vagy 25 µm vastag metszeteket készítettünk.

A metszeteket és a primer lencse sejt kultúrákat elsődleges ellenanyagokkal inkubáltuk (nyúl anti-GAD szérum #6799, nyúl anti-GAD65 szérum N65, nyúl anti-GABA, nyúl anti-DLX2, nyúl anti-GABA_Aβ3, nyúl anti-GABA_BR2, tengerimalac anti-VGAT, tengerimalac anti-GAT1, nyúl anti-GAT3, nyúl anti-Ki-67, egér anti-N-cadherin, egér anti-Pan-cadherin, kecske anti-αA-crystallin and nyúl anti-αB-crystallin), majd a megfelelő másodlagos ellenanyaggal. A reakció detektálásához a következő reagenseket használtuk: Sztreptavidin-konjugált Cy3, Sztreptavidin-konjugált Oregon Green-488 és ExtrAvidin-HRP diaminobenzidinnel reagáltatva H₂O₂ jelenlétében. Bizonyos esetekben a másodlagos ellenanyag fluoreszcens változatát alkalmaztuk (anti-egér (tengerimalac)-Alexa Fluor® 594, anti-kecske (anti-nyúl, anti-egér)-Alexa Fluor® 488). A vizsgálatainkhoz a Zeiss Axioscop-2 mikroszkópot, a Zeiss LSM 510 META és Olympus FV500 konfokális lézer pásztázó mikroszkópot használtuk.

7. Nem-radioaktív *in situ* hibridizáció. A GAD67 mRNA vad típusú egér szemlencséjében történő kimutatására GAD67 specifikus antiszensz ribopróbát használtunk. A CrysGAD67 lencsékben a transzgén által kódolt mRNA-t SV40 specifikus ribopróbával mutattuk ki. Az *in situ* hibridizáció során kontrollként szensz próbát alkalmaztunk. DIG-α-UTP-t használtunk a nem-radioaktív dioxigenin jelölt RNS próba

elkészítéséhez. A hibridizáció és a mosások után humán placentális alkalikus foszfatáz konjugált anti-DIG ellenanyaggal inkubáltuk a metszeteket. Végül a hibridizált próbát alkalikus foszfatáz enzim reakcióval detektáltuk.

8. GABA szint mérése nagynyomású folyadékkromatográfiával (HPLC). A lefagyasztott szemlencsét 0.2 M jéghideg perklórsavban homogenizáltuk, centrifugálással tisztítottuk és neutralizáltuk. A derivatizált 1-(alkylthio)-2-alkylisoinol aminosav származékok elválasztása 5 μ m Discovery HS C-18 (150x4.6 mm) analitikai oszlopon, kimutatásuk pedig fluoriméterrel történt (340 nm-es excitáció és 455-nm emisszió). A koncentráció meghatározáshoz két-pontos kalibrációs görbét és belső standardokat használtunk.

9. Primer lencsehám sejt kultúra. Az újszülött egér szemlencsét jéghideg PBS-ben gyűjtöttük, majd 0.02% EDTA, 0.5 mM DPBS oldatában 37°C-on 10 percet inkubáltuk. A sejteket centrifugáltuk, majd reszuszpendáltuk (Medium 199-10% főtális borjú szérum) és matrigellel bevont fedőlemezekre helyeztük. Két hetes sejt kultúrákat használtunk az immuncitokémiai és kalcium-“imaging” kísérletekhez.

10. Kalcium-“imaging” kísérletek. Frissen izolált újszülött egér szemlencsét és primer lencsehám sejt kultúrákat töltöttünk fel Fluo-4/AM kalcium szenzitív festékkel, majd GABA-t vagy GABA receptor agonistát és antagonistát tartalmazó oldattal mostuk át. Az izolált teljes lencsékkel folytatott kísérletekhez az Olympus FV-500, a primer lencse sejt kultúrák vizsgálatához pedig a Zeiss LSM 510 META konfokális lézer pásztázó mikroszkópot használtuk. Az analízist sejt szinten végeztük és az eredményeket relatív fluoreszcens intenzitásként adtuk meg.

11. Statisztikai értékelés. A statisztikai számításokhoz a GraphPad Prism 5.0 szoftvert használtuk. Adatainkat két mintás Student t-próbával (Ca^{2+} imaging, sejt proliferáció vizsgálata), illetve Spearman korrelációs teszttel (RT-PCR) értékeltük. Mindkét esetben a $*p < 0.05$ értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

Eredmények és Következtetések

1. A GAD izoformák expressziója különböző térbeli és időbeli eloszlást mutat az egér szemlencséiben: korreláció a Dlx2 és Dlx5-el

- Kimutattuk a GABA szintézisét végző GAD enzim minden formája (EGAD, GAD65, GAD67) kifejeződik a fejlődés korai stádiumaitól az egér szemlencséiben.
- Eredményeink azt mutatják, hogy a GAD formák eltérő fejlődési stádium specifikus expressziót mutatnak: a GAD65 és az EGAD az elsődleges lencsehámra és az elsődleges rostsejtekre, míg a GAD67 a másodlagos rostsejtekre jellemző.
- A GABA kimutatható a szemlencséiben a fejlődésének legkorábbi stádiumaitól kezdve. A GABA szintje a késői embrionális korokban, a másodlagos rost differenciáció és elongáció során jelentősen megemelkedik és még a születés után is jelen van az újonnan képződő másodlagos rostsejteketben.
- A GABA és a GAD nagymértékben koncentrálik az megnyúló rostsejtek végeiben, viszont a már differenciált, megnyúlt és organellum-mentes rostsejteketben nem kimutatható. Ez arra utal, hogy a rostsejt megnyúlása során szerepe lehet a sejtváza átrendeződésében.
- Kimutattuk a szemlencséiben a Dlx2 és Dlx5 transzkripció faktorát, melyek a GAD gének aktivátoraként ismertek. Expressziójuk szekvenciális az egér szemlencséiben: a Dlx2 a Dlx5 előtt indukálódik. A Dlx2 időbeli expressziója párhuzamos az EGAD és a GAD65-el, ami azt mutatja, hogy a Dlx2 szükséges lehet a "korai" GAD formák expressziójának indukciójához és/vagy fenntartásához. A Dlx5 expresszió csak részben korrelál a GAD67-el: aktivációja megelőzi a GAD67-et, de a GAD67-el ellentétben a Dlx5 nem fejeződik ki P14 után, ami arra utalhat hogy a Dlx5 a GAD67 indukciójához szükséges, az expresszió fenntartásához viszont nem.

2. A GABA jelátviteli rendszer a fejlődő egér szemlencséiben: a komponensek dinamikus expressziójának szabályozása és funkcionális vizsgálata

- Kimutattuk a GABA-jelátvitel további komponenseinek, a GABA_A és GABA_B receptorok, vezikuláris (VGAT) és membrán transzporterek (GAT) jelenlétét a fejlődő szemlencséiben és primer lencse sejt kultúrákban, és jellemeztük az időbeli és térbeli

expressziójukat a fejlődés során.

- A GABA_A, GABA_B receptorok és a VGAT fehérje jelentős felhalmozódást mutatott az apikális/bazális sejtmembránokon mind a lencsehámban, mind pedig a rostsejtekben, különösen a hátsó lencse varrat (szutura) területén. A VGAT expresszió sokkal jellemzőbb a születés előtti stádiumokra, és a GAT-okkal ellentétben sohasem volt kimutatható a laterális (oldalsó) membránokon. A VGAT nagymértékű felhalmozódása a lencse sejtekben arra utalhat, hogy a vezikuláris transzportnak szerepe lehet a GABA hatás közvetítésében. Továbbá, a GAT-ok szelektív megoszlása az apikális és bazolaterális membránokon lehetővé teheti, hogy aktív szerepet töltsenek be a lencse sejtek ionforgalmának és sejttérfogatának szabályozásában. A lencsehámban a GAT1 és a GAT3 hasonló, főleg apikális/bazális megoszlást mutat, a rostsejtekben viszont az expressziós mintázatok jelentősen eltér. A GAT1 felhalmozódik az apikális/bazális és laterális membránokon, míg a GAT3 egyedi mintázatot mutat: az apikális és laterális membránokon megfigyelhető, míg a hátsó szuturát képező bazális rostsejt-végződéseken nem mutatható ki.

Megállapítottuk, hogy a GABA jelátvitel komponenseinek szigorúan meghatározott időbeli és térbeli expressziója korrelációt mutat a szemlencse fejlődésének meghatározott fázisaival. Eredményeink azt mutatják, hogy jól megfigyelhető váltás van az embrionális és a posztnatális korra jellemző komponensek között. A fejlődő szemlencséjében a GABA_AR (és valószínűleg a GABA_BR) alegység-összetételének változása erős korrelációt mutat egyrészt a GAD65 és EGAD GAD67-re való váltásával, másrészt a VGAT-nak a membrán GABA transporterekkel (GAT) való fokozatos helyettesítésével. Eredményeink arra engednek következtetni, hogy az embrionális szemlencséjében a GAD65 által szintetizált GABA valószínűleg a VGAT segítségével kerül felszabadításra a sejtekből és főként a GABA_AR $\alpha_{2,3}$ alegység összetételű receptorokon hat. A GAD67 által termelt GABA-t viszont valószínűleg a GAT2 juttatja ki a sejtéből és az α_1 alegységet tartalmazó GABA_AR-okon keresztül fejti ki a hatását. Az enzimatikusan aktív GAD44, amely embrionális megfelelője a GAD67-nek, koexpressziót mutat a GAD65-el; az által szintetizált GABA felszabadítása egy vagy több GAT fordított irányú működésével történhet.

- Intakt szemlencséjében és primer lencse sejt kultúrákon a GABA, valamint

agonista/antagonista hatására kiváltott intracelluláris kalcium válaszok mérésével igazoltuk, hogy mind a GABA_A mind pedig a GABA_B receptorok funkcionálisan aktívak az egér szemlencséiben. A GABA, a GABA_A receptor agonista muscimol és a GABA_B receptor agonista baklofen az $[Ca^{2+}]_i$ növekedését okozták, melyet specifikus antagonistákkal blokkolni tudtunk.

Mivel a szemlencse equatoriális zónájában lévő sejtekben, amelyek proliferálnak, migrálnak és differenciálódnak, jelen van a funkcionális GABA jelátviteli rendszer, feltételezhető hogy az idegrendszerhez hasonlóan a GABA parakrin/autikrin módon az $[Ca^{2+}]_i$ szint szabályozásán keresztül modulálhatja a sejt ciklust, a sejt migrációt és rostsejt megnyúlást.

3. A GABA *in vivo* szerepe a szemlencse fejlődése során, ahogyan azt a genetikailag megváltoztatott GAD szinttel rendelkező egér modellek mutatják

- A GABA szemlencse fejlődésében betöltött szerepének *in vivo* tanulmányozására olyan transzgenikus egérmodelleket hoztunk létre és vizsgáltunk amelyekben a GAD67 szemlencséiben való túltermelésével megnöveltük a GABA szintet. Továbbá a GAD65 illetve GAD67 génhányos egerekben vizsgáltuk a csökkent GABA szint hatását a lencse fejlődésére.
- A fejlődés korai stádiumától, már a lencse vezikulában kimutatható volt az elsődleges lencse rostsejtek elongációjának zavara: a csökkent GAD65 szint késleltette, míg a GAD67 túltermelése felgyorsította a folyamatot. A GAD67 hiány viszont nem okozott zavart a rostsejtek elongációjában, tehát valószínűsíthető, hogy az ebben a stádiumban domináló GAD65 játszik szerepet az elsődleges lencse rostsejtek elongációjának szabályozásában.
- A perinatális stádiumokban a sejtproliferáció is zavart szenvedett, a GAD67 szint csökkenése gátolta, míg a GAD67 túltermelés növelte a proliferáció mértékét a lencsehám germinatív zónájában, míg a GAD65 hiánya nem befolyásolta a proliferációt. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a GAD67 által termelt GABA a késői lencse hámsajt proliferációt szabályozhatja, amely folyamat a másodlagos lencse rostsejtek képződését biztosítja.

- A késői embrionális és posztinatális szemlencsékben a GAD67 túltermelése többféle zavart okozott: pl. rendellenes másodlagos rostsejt elrendeződést, kataraktát (szürkehályogot) és nyitott szuturát. Ezek a fejlődési rendellenességek mind összefüggésbe hozhatóak a GABA sejt differenciációt szabályozó szerepével.

Összefoglalva eredményeink azt mutatják, hogy az idegrendszerben betöltött szerepéhez hasonlóan a GABA trofikus faktorként fontos szerepet játszik a szemlencse fejlődésében a korai fejlődési stádiumoktól kezdődően. Valószínűleg a sejtproliferációt, a rostsejt differenciációt és migrációt modulálja. A GABA jelátvitel komponenseinek expressziós vizsgálatai és a megváltoztatott GABA-jelátvitellel rendelkező transzgenikus egerek fenotípusa alapján azt feltételezhetjük, hogy a korai GAD-ok által szintetizált GABA az elsődleges lencse rostsejtek differenciációjában, míg a GAD67 által létrehozott GABA a lencsehám germinatív zónájában sejtproliferáció és a másodlagos rostsejtek differenciációjának szabályozásában vesz részt. A GABA kiemelt funkciót tölt be a sejtadhézió szabályozásában is, amely meghatározó a lencse szerkezetének kialakulásában.

Publikációs lista

I. Tudományos folyóiratokban megjelent eredeti közlemények:

1. **Andrea Kwakowsky**, Marija Schwirtlich, Qi Zhang, David D. Eisenstat, Ferenc Erdélyi, Mária Baranyi, Zoya D. Katarova and Gábor Szabó. „GAD isoforms exhibit distinct spatiotemporal expression patterns in the developing mouse lens: correlation with Dlx2 and Dlx5.” Dev Dyn. 2007 Dec; 236(12):3532-44. PMID: 17969168

2. **Andrea Kwakowsky**, Marija Schwirtlich, Frank Kooy, István Ábrahám, Zoltán Máté, Zoya Katarova and Gábor Szabó. “GABA neurotransmitter signaling in the developing mouse lens: dynamic regulation of components and functionality.” Dev Dyn. 2008 Sep (nyomdában)

3. **Andrea Kwakowsky**, Marija Schwirtlich, Zsuzsa Emri, Zoya D. Katarova and Gábor Szabó. “GABA_A and GABA_B receptor-induced Ca transients in primary lens epithelial cell cultures expressing active GABA signaling components.” Exp. Eye Res. (benyújtás alatt)

II. Konferencia kivonatok:

1. Z. Katarova, A. Kwakowsky, M. Schwirtlich, F. Erdélyi and G. Szabó. “Studies on the role of the GABA signaling in the developing eye”. IBRO 2003, Prague

2. Z. Katarova, **A. Kvakovsky**, M. Schwirtlich, F. Erdélyi, I. Szatmári and G. Szabó. „Role of GABA signaling in the developing eye: ocular defects caused by overexpression of different GAD forms in the lens of transgenic mice.” MITT IX. 2003, Balatonfüred
3. **Andrea Kvakovszki**, Marija Schwirtlich, Ferenc Erdélyi, Mária Baranyi, Zoya Katarova and Gábor Szabó. „GAD expression is critical for eye development at late embryonic stages.” International IBRO Workshop 2004, Budapest. Clinical Neuroscience 2006;57
4. Zoya Katarova, **Andrea Kvakovszky**, Marija Schwirtlich, Marija Baranyi and Gábor Szabó. „GAD expression is critical for eye development at late embryonic stages.” JAX Neurogenetics Conference V. 2004, Bar Harbor
5. **Kwakowsky A.**, Schwirtlich M., Katarova Z., Baranyi M., Erdélyi F., Szabó G. „GABA signaling during mouse lens development.” International IBRO Workshop 2006, Budapest. Clinical Neuroscience 2006;59(S1):39
6. **Kwakowsky A.**, Katarova Z., Schwirtlich M., Baranyi M., Erdélyi F., Yanagawa Y. and Szabó G. “Overexpression of GAD67 in the mouse lens results in multiple ocular defects.” MITT 2007, Szeged
7. **Kwakowsky A.**, Schwirtlich M., Katarova Z., Yanagawa Y. and Szabó G. “GABA signaling during mouse lens development: components and functionality.” International IBRO Workshop 2008, Debrecen
8. **Kwakowsky A.**, Schwirtlich M., Katarova Z., Yanagawa Y. and Szabó G. „GABA signaling during mouse lens development.” FENS 2008, Geneve. FENS Forum Abstracts
9. **Kwakowsky A.**, Katarova Z., Schwirtlich M., Emri Zs. Yanagawa Y. and Szabó G. „GABA signaling during mouse lens development: components and functionality.” GRC 2008, Newport, RI

III. Előadások:

1. **A. Kwakowsky**, Z. Katarova, M. Schwirtlich, G. Szabó. „GABA signaling in the developing eye.” VII. KOKI Napok 2003, Tihany
2. **Kwakowsky Andrea**. „A GABA-jelátvitel vizsgálata immuncitokémiai módszerekkel.” Invitrogen Cellular Imaging Roadshow 2008, Budapest
3. **Kwakowsky Andrea**. „A GABAerg rendszer szerepe a szemlencse fejlődésében.” Magyar Mikroszkópos Társaság Konferenciája 2008, Balatonalmádi